

EKSTRAKSI DNA *Phytophthora palmivora* ISOLAT KELAPA

(EXTRACTION OF COCONUT ISOLATE OF *Phytophthora palmivora* DNA)

Achmadi Priyatmojo dan Siti Subandiyah
Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Coconut isolate of *Phytophthora palmivora* DNA was extracted from sporangium and mycelium using SDS and Proteinase-K method. Sporangium and mycelium were harvested from liquid and solid culture of Potato Dextrose medium.

The result of the study showed that the DNA extracted from sporangium and mycelium of 8 days solid culture was seen as distinct band. On the other hand, the DNA from sporangium and mycelium of 24 days old liquid culture was fragmented with smear band appearance.

Key word: DNA extraction, *Phytophthora palmivora*

INTISARI

DNA *Phytophthora palmivora* isolat kelapa yang berasal dari sporangium dan miselium diekstraksi menggunakan metode SDS dan Proteinase-K. Sporangium dan miselium dipanen dari medium kentang dekstroza cair dan padat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA yang diekstraksi dari sporangium dan miselium pada medium kentang dekstroza padat berumur 8 hari mempunyai pita DNA yang jelas dan bersih, sedangkan sporangium dan miselium berumur 24 hari pada medium kentang dekstroza cair terlihat pita DNA terfragmentasi dengan kenampakan pita DNA yang smear.

Kata kunci : Ekstraksi DNA, *Phytophthora palmivora*

PENGANTAR

Kelapa (*Cocos nucifera*) adalah salah satu tanaman industri yang tersebar luas di seluruh kepulauan Indonesia. Jenis kelapa yang ditanam di sebagian sentra kelapa adalah varietas lokal atau kelapa jangkung yang produksinya sangat rendah (kurang dari 1 ton kopra per ha per tahun). Usaha meningkatkan produksi kelapa dilakukan dengan menanam kelapa hibrida (Brahmana dan Lubis, 1995).

PB 121 (Genjah Merah Kamerun x Jangkung Afrika Barat) merupakan varietas yang banyak ditanam di sentra kelapa karena produksinya tinggi (4 - 5 ton kopra per ha per tahun) dan awal produksinya lebih cepat (3 - 3,5 tahun). Namun PB 121 ternyata rentan terhadap penyakit busuk tunas yang disebabkan oleh *P. palmivora* Butl. (Butl.) (Brahmana dan Lubis, 1995). Bahkan survei yang dilakukan oleh Direktorat Jenderal Perkebunan pada tahun 1991 sampai dengan 1992 melaporkan bahwa *P. palmivora* dapat menyerang

pada semua jenis kelapa baik genjah, hibrida maupun jangkung (Dirjenbun, 1992). Menurut Semangun (1988), selain menyebabkan penyakit busuk tunas pada kelapa, *P. palmivora* dapat juga menyebabkan penyakit gugur buah (*nutfall*). Kerugian yang disebabkan oleh *P. palmivora* yang menyerang kelapa ini dapat mencapai 4,6 milyar per tahun (Brahmana dan Lubis, 1995).

P. palmivora adalah jamur yang mempunyai kisaran tanaman inang yang luas antara lain kelapa, kakao, karet, lada, papaya, durian, pala, jeruk, kina, siwalan, dan pinang (Chee, 1974; Zentmyer, 1974; 1983; Semangun, 1988). Hampir semua bagian tanaman seperti akar, batang, ranting, buah, dan daun dapat diserang oleh *P. palmivora*.

Dalam siklus hidupnya, *P. palmivora* menghasilkan oospora, klamidospora, dan sporangium. Identifikasi *Phytophthora* kebanyakan lebih ditekankan pada morfologi jamur dan tanggapan pertumbuhan jamur terhadap perlakuan beberapa faktor lingkungan (Waterhouse *et al.*, 1983).

Namun menurut Erwin (1983), identifikasi yang berdasarkan pada morfologi dan tanggapan pertumbuhan jamur tersebut mengalami kesulitan karena variabilitas yang terjadi pada *Phytophthora*.

Zentmyer (1983), mencoba melakukan identifikasi *Phytophthora* berdasarkan karakteristik pola protein jamur dengan menggunakan gel elektroforesis. Dalam penelitian-penelitian dewasa ini identifikasi jamur dilakukan dengan melihat pola fragmen-fragmen DNA.

Pola fragmen DNA untuk identifikasi dapat diperoleh melalui metode-metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dan RAPD (*Random Amplification Polymorphism DNA*). Untuk metode RFLP diperlukan preparat DNA yang relatif bersih atau murni sehingga proses restriksi (pemotongan DNA oleh enzim restriksi menjadi fragmen-fragmen DNA) dapat berlangsung optimal. Lebih lanjut proses hibridisasi DNA pelacak (*DNA probes*) dengan gen-gen pada fragmen-fragmen DNA tersebut juga akan terjadi dengan baik sehingga dapat menghasilkan pola tertentu (Gabriel & de Feyter, 1992).

Pada RAPD, tingkat kemurnian preparat DNA mungkin tidak harus setinggi untuk RFLP tetapi keutuhan DNA tetap diperlukan sebagai cetakan (*template*) DNA. Dari cetakan DNA yang utuh, maka akan dihasilkan pola RAPD yang sempurna (McPherson *et al.*, 1992).

Ada beberapa metode ekstraksi DNA jasad eukariot termasuk jamur (Kirby, 1990; Clarkson, 1992; Gurr & McPherson, 1992). Modifikasi metode ekstraksi DNA menggunakan SDS dan Proteinase-K untuk tanaman (Draper & Scott, 1988), dicoba digunakan untuk ekstraksi DNA jamur.

BAHAN DAN METODE

1. Isolasi dan Pemeliharaan *P. palmivora*

P. palmivora diisolasi dari tanaman kelapa sakit busuk tunas dari Perkebunan Kelapa Segayung Utara PT. Pagilaran, Batang. Medium PDA digunakan dalam isolasi dan pemeliharaan *P. palmivora* untuk perlakuan berikutnya.

Kultur *P. palmivora* hasil isolasi disubkultur pada dua macam medium yaitu

medium *Potato Dextrose* (medium cair) dan *Potato Dextrose Agar* (medium padat). Kultur kemudian diinkubasikan pada suhu 25 °C. Pada saat dilakukan ekstraksi DNA, *P. palmivora* pada medium cair telah berumur 24 hari, sedangkan *P. palmivora* pada medium padat berumur 8 hari.

2. Penyiapan Sampel

Isolasi DNA dilakukan dari sporangium pada medium cair (sampel 1), miselium pada medium cair (sampel 2), sporangium pada medium padat (sampel 3), dan miselium pada medium padat (sampel 4). Berat miselium dari medium cair yang digunakan adalah 3 gram. Sporangium dari medium cair didapatkan dengan cara mengambil cairan sebanyak 1.5 ml dimasukkan ke dalam tabung ependorf kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit dan diambil pelet sporangiumnya. Pada medium padat sporangium didapatkan dengan cara menyemprotkan aquades steril menggunakan pipet Pasteur ke permukaan miselium kemudian cairan ditampung dalam tabung ependorf dan disentrifugasi untuk diambil pelet sporangiumnya.

3. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode SDS dan Proteinase-K (Draper & Scott, 1988).

Nitrogen cair dituang dalam masing-masing mortir yang berisi sampel miselium. Miselium kemudian digerus sampai berbentuk tepung. Pelet sporangium dari kultur cair sebanyak dicuci dengan bufer Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Pelet sporangium dari medium padat tidak perlu dicuci. Semua sampel (1 - 4) ditambah dengan 750 µl buffer ekstraksi (buffer S : Tris-HCl 2 M pH 8,5; NaCl 5 M; EDTA 0,5 M pH 8,0; SDS 25% + 0,1 mg/ml Proteinase K). Sampel miselium dipindahkan ke tabung Eppendorf dan semua sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Selanjutnya 700 µl phenol ditambahkan dan diinkubasikan lagi pada suhu 37°C selama 30 menit. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Cairan pada lapisan atas diambil dan dipindahkan ke tabung yang bersih kemudian ditambah 750 µl kloroform dan dicampur dengan baik. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C

selama 4 menit. Cairan pada lapisan atas diambil dan dipindah ke tabung yang bersih dan ditambah dengan 750 µl isopropanol kemudian dicampur dengan baik dan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet (endapan) yang ada dicuci dengan dituangi etanol 70% secara hati-hati agar pelet tetap menempel di dasar tabung dibiarkan beberapa saat kemudian secara hati-hati pula etanol dibuang. Tabung ependorf dibiarkan terbuka beberapa saat agar etanol menguap. Pelet disuspensikan dalam 200 µl bufer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM).

Sampel ditambah dengan 1 µl RNA-se dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 60 menit kemudian diekstraksi dengan 200 µl phenol. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Cairan pada lapisan atas diambil dan diekstraksi dengan 200 µl kloroform kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C selama 4 menit. Cairan pada lapisan atas diambil dan ditambah dengan 30 µl Sodium asetat 3 M, pH 5,6 kemudian ditambah dengan EtOH dingin menjadi dua kali volume sampel. Sampel digoyang secara perlahan-lahan supaya DNA mengendap dan diinkubasikan semalam pada suhu -20 °C.

Sampel disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm, suhu 4 °C selama 20 menit. Pelet diambil kemudian dicuci dengan etanol 70% dan dibiarkan kering angin setelah itu disuspensikan dalam 50 µl aquades steril atau bufer TE dan disimpan pada suhu -20 °C untuk perlakuan berikutnya.

4. Konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA diamati dengan menggunakan spektrofotometer (Beckman DU - 65) pada panjang gelombang 260 nm.

5. Kondisi Elektroforesis

Agarose dengan konsentrasi 1% dalam bufer TBE 1x (Tris-HCl Boric acid EDTA) digunakan dalam elektroforesis (Mupid-2). Elektroforesis dijalankan pada 100 Volt selama 60 menit. DNA pada gel dicat dengan merendam gel dalam larutan *ethidium bromide* selama 10 menit, kemudian diamati dengan transiluminator uv dan difoto menggunakan kamera polaroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi DNA dari masing-masing sampel sangat bervariasi (Tabel 1). Konsentrasi DNA tertinggi pada sampel miselium dari medium cair yaitu sebesar 3290 µg/ml, sedangkan konsentrasi DNA yang terendah pada sampel sporangium dari medium padat yaitu sebesar 115 µg/ml.

Tabel 1. Konsentrasi DNA dari empat sampel
Table 1. DNA concentration of four samples

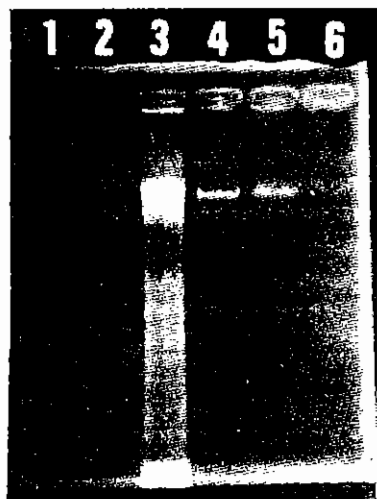
Macam sampel Sample	Konsentrasi DNA (µg/ml) DNA concentration
Sporangium (medium cair)	287,5
Miselium (medium cair)	3290,0
Sporangium (medium padat)	115,0
Miselium (medium padat)	137,5

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa sampel yang berasal dari medium cair baik sporangium maupun miselium terlihat DNA-nya terdegradasi (pita DNA tidak terlihat mengumpul membentuk garis tetapi *smear* akibat telah terfragmentasi). Hal ini kemungkinan karena umur kultur yang sudah tua (umur 24 hari). Pada sampel yang berasal dari medium padat (umur 8 hari) baik sporangium maupun miselium mempunyai pita DNA yang jelas. Sampel DNA *P. palmivora* sebanyak 1,15 µg (sporangium) dan 1,375 µg (miselium) sudah membentuk pita DNA yang jelas. Pita DNA sporangium dari medium padat lebih jelas daripada pita DNA miselium dari medium padat (Gambar 1).

Sporangium dan miselium *P. palmivora* berumur 8 hari yang ditumbuhkan pada medium PDA dapat digunakan sebagai sampel untuk ekstraksi DNA.

Metode SDS dan Proteinase-K yang telah dimodifikasi dapat digunakan untuk mengekstraksi DNA jamur dengan menghasilkan konsentrasi DNA yang cukup dan pita DNA pada gel agarose yang jelas dan bersih.

Penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode RFLP atau RAPD perlu dilakukan untuk dapat mengidentifikasi *P. palmivora* isolat kelapa dan membedakannya dengan isolat-isolat lainnya.



Gambar 1. Pita DNA *Phytophthora palmivora* isolat kelapa hasil elektroforesis

Keterangan (note):

1. kosong (blank);
2. miselium dari medium cair (sporangium from culture of liquid medium);
3. sporangium dari medium cair (mycelium from culture of liquid medium);
4. miselium dari medium padat (sporangium from culture of solid medium);
5. sporangium dari medium padat (mycelium from culture of solid medium);
6. kosong (blank)

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Bambang Hadisutrisno, DAA yang telah memberi ijin menggunakan *P. palmivora* koleksi beliau; Dr. Ir. Susanto yang telah banyak memberikan saran-saran serta Dr. Ir. Wayan T. Artama yang telah mengizinkan penggunaan fasilitas alat di Laboratorium Biokimia PAU Bioteknologi.

DAFTAR PUSTAKA

Brahmana, J dan A. U. Lubis. 1995. Pengendalian terpadu penyakit busuk umbut basah *Phytophthora palmivora* di perkebunan kelapa. *Risalah Kongres Nasional XII dan Seminar Ilmiah PFI*. Yogyakarta. 1156 hal.

Clarkson, J.M. 1992. Fungi, p. 67 - 78. In : Gurr, S.J., M.J. McPherson, & D.J. Bowles (eds.), *Molecular plant pathology volume I*. Oxford Univ. Press. Oxford. London. 216 p.

Dirjenbun. 1992. Survei penyakit busuk pucuk (*Phytophthora* sp.) pada beberapa varietas kelapa di Indonesia. Direktorat Jenderal Perkebunan Departemen Pertanian. Jakarta. 35 hal.

Draper, John & R. Scott. 1988. The isolation of plant nucleic acids, p. 199 - 236. In : Draper, J., R. Scott, P. Armitage & R. Walden (eds.), *Plant genetic transformation and gene expression*. The Alden Press. Oxford. 355 p.

Erwin, D.C. 1983. Variability within and among species of *Phytophthora*, p. 149 - 165. In : Erwin, DC., S. Bartnicki-Garcia & P.H. Tsao (eds.), *Phytophthora Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. APS., St. Paul. 187 p.

Gabriel, D.W. & R. de Feyter. 1992. RFLP analyses and gene tagging for bacterial identification and taxonomy, p. 51 - 66. In : Gurr, S.J., M.J. McPherson, & D.J. Bowles (eds.), *Molecular plant pathology volume I*. Oxford Univ. Press. Oxford. London. 216 p.

Gurr, S.J. & M.J. McPherson. 1992. Nucleic acid isolation and hybridization techniques, p. 109 - 122. In : Gurr, S.J., M.J. McPherson, & D.J. Bowles (eds.), *Molecular plant pathology volume I*. Oxford Univ. Press. Oxford. London. 216 p.

Kirby, L.T. 1990. DNA fingerprinting an introduction. M. Stockton Press. New York. 365 p.

McPherson, M.J., R.J. Oliver & S.J. Gurr. The polymerase chain reaction, p. 123 - 146. In : Gurr, S.J., M.J. McPherson, & D.J. Bowles (eds.), *Molecular plant pathology volume I*. Oxford Univ. Press. Oxford. London. 216 p.

Semangun, Haryono. 1988. Penyakit-penyakit tanaman perkebunan di Indonesia. Gadjah Mada Press. Yogyakarta. 808 hal.

Waterhouse, G.M., F.J. Newhook, and D.J. Stamps. 1983. Present criteria for classification of *Phytophthora*, p. 139 - 147. In : Erwin, DC., S. Bartnicki-Garcia & P.H. Tsao (eds.), *Phytophthora Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. APS., St. Paul. 187 p.

Zentmyer, G.A. 1974. Variation, genetics, and geographical distribution of mating types, p. 89 - 101. In : Gregory, P.H (ed.), *Phytophthora disease of cocoa*. Longman Group Limited. London.

Zentmyer, G.A. 1983. The world of *Phytophthora*, p. 1 - 9. In : Erwin, DC., S. Bartnicki-Garcia & P.H. Tsao (eds.), *Phytophthora Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. APS. St. Paul. 187p.